Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 765-777

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۷۷۷-۷۶۵

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
**Full Research Paper**

# Effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the thermal stability of the anthocyanin extract of Saffron petal in the model drink

**Hamed Saberian[*1], Vahid Pasban[2]**

Received: 2021.09.06
Revised: 2022.02.12
Accepted: 2022.04.11
Available Online: 2022.04.11

**How to cite this article:**
Saberian, H., Pasban, V. (2022). Effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the thermal stability of the anthocyanin extract of Saffron petal in the model drink. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 18 (5), 756-777.

## Abstract

**Introduction:** Anthocyanins are one of the most important of food colorants, which are found in many fruits, flowers, and vegetables, and have been used as natural pigments in commercial foods and beverage products due to their desirable colors and potential nutritional benefits. Saffron (*Crocus sativus*) is the most expensive spice of the world and an average 86.4% of wet weight or 96.4% of dry weight of saffron flowers is related to petals. Saffron petals usually do not have a commercial value but contain large amounts of anthocyanins, flavonoids and glycosides. Thus, these petals can be a good source of natural dyes applicable in pharmaceuticals, confectionery, and soft drinks. However, anthocyanins are readily unstable compounds with exposure to oxygen, pH, temperature, enzyme, light, as well as surrounding components, which reduces food color and quality. Losses of anthocyanins occur during juice processing and storage, and methods are needed to prevent these losses. Up to now, various methods including the encapsulation and the co-pigmentation have been tried to intensify the stability of anthocyanins. The co-pigmentation based on the molecular interactions, has been shown to be an efficient way to stabilize anthocyanins. The addition of organic acids, flavonoids, alkaloids, polysaccharides, proteins, etc. as a co-pigment, can improve the stability, and change the bioactivity of anthocyanins. Encapsulation of anthocyanins by alpha and beta cyclodextrins is a potential treatment that could d anthocyanin losses. Anthocyanins can form inclusion complexes with cyclodextrin molecules, which may protect anthocyanins from hydration and polymerization reactions. Therefore, saffron petal is a potential resource of anthocyanin in Iran. Low thermal stability of the anthocyanins caused a tendency to the synthetic colorants. Therefore, the main goal of this research was to investigate the effect of cyclodextrins and co-pigmentation on the anthocyanin extract of saffron petal during heat treatment.

**Materials and Methods:** Anthocyanin extract of saffron petal was extracted by 50% acidic ethanol solution at ambient temperature. Acidified extract was concentrated by a rotary evaporator at 40˚C up to 9 percent concentration of solid materials. Different concentrations of alpha and beta cyclodextrin (10, 25, 50, 75 and 100 mole alpha or beta cyclodextrin to one mole anthocyanin) and also, different co-pigments such as gallic acid (at two molar ratio of 50:1 and 100:1of galic acid/anthocyanin), ferulic acid (at two molar ratio of 50:1 and 100:1of ferulic acid/anthocyanin), quercetin (at two molar ratio of 2.5:1 and 5:1 of quercetin/anthocyanin) and rutin (at two molar ratio of 10:1 and 25:1 of rutin/anthocyanin) were used to study the thermal stability of anthocyanin. Furthermore, the hydroalcoholic extract of rosehip was prepared and concentrated thereby, the rosehip extract (at two molar ratio of 50:1 and 100:1gallic acid equivalent/anthocyanin) was used as a co-pigment. Total anthocyanin content was measured using differential pH method and reported based on mg of cyanidin 3-glucoside per 100 ml the model drink. *a** value was measured by Hunter Lab. Model drink (20 mM acid citric buffer in pH of 3) containing 0.01 % $CaCl_2$ and anthocyanin extract was prepared.

1. Assistant Professor of Food Additives Department, Food Science and Technology Research Institute, ACECR, Khorasan Razavi, Iran.
2. MSc. Student, Department of Food Science and Technology, ACECR Kashmar Higher Education Institute, Kashmar, Iran.
(*Corresponding Author Email: Saberian@acecr.ac.ir)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.72368.1095

Prepared model drinks were heated at 90 °C during 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min and then, were cooled up to room temperature. Half time of anthocyanin was calculated and the mentioned treatments were investigated to evaluate the stability of the different compounds.

**Results and Discussion:** The results indicated that alpha cyclodextrin at molar ratio of 50:1 (alpha cyclodextrin to anthocyanin) hadn't any significant effect on the anthocyanin stability but beta cyclodextrin at molar ratio of 50:1 increased the colorant stability, which can be due to the smaller cavity of alpha cyclodextrin rather than beta cyclodextrin that lead to the lower interaction between alpha cyclodextrin and anthocyanin. Although, phenolic co-pigments hadn't any significant effect on the anthocyanin stability of the model drink but the rosehip extract at two molar ratios of 50:1 and 100: 1 increased the anthocyanin retention. Total phenolic content of rosehip extract was 14.56 g gallic acid equivalent per liter of the extract and total flavonoid content was 365 mg quercetin equivalent per liter of the extract. According to the studies and our results about total phenol and flavonoid content, the increased retention of the anthocyanin can be related to the variety of the phenolic and flavonoid compounds of the rosehip extract. Therefore, beta cyclodextrin as a trapping agent and rosehip extract as a co-pigment, can increase the anthocyanin stability of the saffron petal during heat treatment.

**Keywords:** Thermal stabilization, Anthocyanin, saffron petal, β-cyclodextrin, Rosehip extract.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 5, Dec- Jan 2022, p. 765-777

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۵، آذر- دی ۱۴۰۱ ص.۷۷۷-۷۶۵

مقاله علمی-پژوهشی

# تاثیر سیکلودکسترین‌ها و کوپیگمانتاسیون بر پایداری حرارتی عصاره آنتوسیانینی گلبرگ زعفران در نوشیدنی مدل

حامد صابریان[1]*- وحید پاسبان نوقابی[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

## چکیده

آنتوسیانین‌ها یکی از مهمترین رنگدانه‌های غذایی هستند که کاربرد گسترده‌ای در محصولات غذایی دارند. یکی از منابع مستعد آنتوسیانین در ایران، گلبرگ زعفران می‌باشد. پایداری حرارتی نسبتا پایین آنتوسیانین‌ها موجب استفاده بیشتر از رنگ‌های سنتزی شده است. هدف این پژوهش، بررسی تاثیر سیکلودکسترین‌ها و کوپیگمانتاسیون بر پایداری عصاره آنتوسیانینی استخراجی از گلبرگ زعفران در برابر تیمار حرارتی بود. از غلظت‌های مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/ بتاسیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین) و همچنین از کوپیگمان‌های مختلفی ازقبیل گالیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، فرولیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، کوئرستین (در دو نسبت مولی ۲/۵ به ۱ و ۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و روتین (در دو نسبت مولی ۱۰ به ۱ و ۲۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و عصاره نسترن کوهی (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ معادل گالیک اسید به آنتوسیانین) برای بررسی پایداری حرارتی آنتوسیانین‌ها استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که آلفاسیکلودکسترین تاثیر معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<0.05$) بر پایداری آنتوسیانین نداشت اما بتاسیکلودکسترین در نسبت مولی ۵۰ به ۱ (بتاسیکلودکسترین به آنتوسیانین) موجب افزایش پایداری رنگدانه شد. اگرچه ترکیبات فنولی تاثیری در پایدارسازی حرارتی آنتوسیانین‌های نوشیدنی مدل نداشتند اما عصاره نسترن کوهی در هر دو نسبت مولی ۵۰ و ۱۰۰ به ۱ موجب افزایش معنی‌دار بقاء آنتوسیانین‌ها شد. بنابراین، بتاسیکلودکسترین به‌عنوان یک ترکیب پوشاننده و عصاره نسترن کوهی به‌عنوان یک ترکیب کوپیگمان می‌توانند موجب افزایش پایداری آنتوسیانین گلبرگ زعفران طی تیمار حرارتی شوند.

**واژه‌های کلیدی:** پایدارسازی حرارتی، آنتوسیانین، گلبرگ زعفران، بتاسیکلودکسترین، عصاره نسترن کوهی.

## مقدمه

رنگدانه‌های طبیعی، جایگزین بسیار مناسبی برای رنگ‌های سنتزی هستند و کاربرد آن‌ها در غذاها و نوشیدنی‌ها افزایش یافته است. افزایش کاربرد رنگدانه‌های سنتزی به دلیل رشد آگاهی‌های جامعه از اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی و خطرات زیست‌محیطی آن‌ها می‌باشد (Carocho et al., 2014). آنتوسیانین‌ها، رنگدانه‌های غذایی طبیعی محلول در آب هستند که در طیف گسترده‌ای از میوه‌ها، سبزیجات و گل‌های مختلفی وجود دارند و مسئول ایجاد رنگ‌های قرمز، ارغوانی و آبی در آن‌ها می‌باشد (Ge et al., 2018).

آنتوسیانین‌ها به‌عنوان رنگدانه‌های غذایی در گستره وسیعی از محصولات از قبیل محصولات لبنی، نوشیدنی‌های با pH پایین، ژله‌ها و پاستیل‌ها و همچنین محصولات پختی (مانند کیک) کاربرد دارند (Chung et al., 2016).

زعفران (*Crocus sativus L.*) از جمله منابع گیاهی با ارزش بومی است که عمدتا در مناطق گرم و خشک کشت می‌شود. بعد از جداسازی کلاله از گل زعفران، محصولات جانبی زعفران شامل کاسبرگ، گلبرگ، خامه و پرچم زعفران باقی می‌ماند. این مواد اگرچه حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای ترکیبات با ارزش می‌باشند اما در حال حاضر به‌عنوان ضایعات بخش کشاورزی، بدون استفاده بوده و تنها به مصرف

۱- استادیار، گروه پژوهشی افزودنی‌های غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، موسسه آموزش عالی جهاد دانشگاهی کاشمر، کاشمر، ایران.
* - نویسنده مسئول: Email: Saberian@acecr.ac.ir
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2022.72368.1095

خوراک دام می‌رسند یا در محیط زیست رها می‌شوند (Einafshar, 2018). منابع عمده آنتوسیانین‌ها در جهان، پوست و تفاله انگور قرمز و هویج سیاه (یا ارغوانی) می‌باشد. با توجه به اینکه این منابع عمدتا بومی کشور ما نمی‌باشند، قاعدتا در اولویت قرار نمی‌گیرند. از طرفی، باتوجه به تولید سالیانه حدود ۳۰۰ هزار تن گلبرگ زعفران در کشور و هدر رفت آن در مزارع، این منبع از پتانسیل بسیار مناسبی، به‌عنوان منبع ارزان قیمت، وافر و در دسترس، برای تولید آنتوسیانین برخوردار می‌باشد.

اگرچه آنتوسیانین‌ها کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و داروئی دارند اما معایب آن‌ها ازقبیل پایداری نسبتا پایین در مقایسه با رنگ‌های سنتزی، ایجاد چالش کرده است (Cortez et al., 2014). عوامل فیزیکوشیمیایی مختلفی ازقبیل pH محصول، قرار گرفتن در معرض نور، دما و ایجاد کمپلکس با ترکیبات دیگر موجود در محصول، پایداری آنتوسیانین‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Sui et al., 2014). روش‌های مختلفی جهت کاهش تخریب آنتوسیانین‌ها به‌عنوان مسأله اصلی این پژوهش ارائه شده است که مهمترین آن‌ها شامل ریزپوشانی و کوپیگمانتاسیون[۱] آنتوسیانین‌ها می‌باشد (Khazaei et al., 2014; Li et al., 2016; Chung et al., 2015; Fernandes et al., 2013; Howard et al., 2013).

ریزپوشانی آنتوسیانین‌ها با سیکلودکسترین ها فرآیند مطلوبی جهت کاهش تخریب آن‌ها می‌باشد. علاوه بر این، ریزپوشانی می‌تواند موجب بهبود زیست فراهمی آنتوسیانین‌ها در دستگاه گوارش گردد. آنتوسیانین‌ها قادر هستند با بتاسیکلودکسترین پیوند و تشکیل کمپلکس دهند تا از واکنش های هیدراتاسیون و پلی‌مریزاسیون در امان بمانند (Howard et al., 2013). با به دام انداختن آنتوسیانین‌ها در ماتریس پلی‌مری، آن‌ها کمتر در معرض اکسیژن قرار می‌گیرند و بنابراین پایداری و زمان انبارمانی بیشتری خواهند داشت (Weber et al., 2017).

واکنش آنتوسیانین‌ها با سایر ترکیبات از قبیل ترکیبات فنولی، به‌عنوان یک روش پایدارسازی مورد توجه قرار گرفته است. این واکنش‌ها شامل واکنش بین آنتوسیانین‌ها (Self-association)، کوپیگمانتاسیون داخل مولکولی با گروه‌های آروماتیک و کوپیگمانتاسیون بین مولکولی با مواد غیررنگی مانند فلاونول یا فلاون‌ها می‌باشد (Cavalcanti et al., 2011). کوپیگمانتاسیون بر پایه واکنش مولکولی به‌عنوان روش موثری در این زمینه شناخته شده است به‌گونه‌ای که با افزودن اسیدهای آلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و غیره می‌توان پایداری آنتوسیانین‌ها را بهبود بخشید. مکانیسم عمل عمدتا به ساختار شیمیایی آنتوسیانین‌ها (تعداد گروه‌های هیدروکسیل و متوکسیل، سطح گلیکوزیله شدن) و محیط حلال وابسته است (Asen et al., 1972). تجمع آسیلی حلقه پیران، حساسیت آنتوسیانین به حمله نوکلئوفیلی آب را کاهش می‌دهد و در نتیجه از تشکیل چالکون و بی‌رنگ شدن آنتوسیانین جلوگیری می کند. بنابراین، آنتوسیانین‌های آسیله شده مقاومتر می‌باشند. پدیده کوپیگمانتاسیون غالبا موجب تغییر طول موج جذب به سمت طیف قرمز[۲] همراه با افزایش جذب و همچنین ایجاد رنگ پایدارتر طی زمان می‌شود (Mazza and Miniati, 1993).

تحقیقات مختلفی با هدف کاهش تخریب رنگ عصاره‌های آنتوسیانینی از گیاهان و میوه‌های مختلف با استفاده از گالیک اسید (Mollov et al., 2007; Zhao et al., 2020)، کوئرستین (Fan et al., 2019)، فرولیک اسید (Weber et al., 2017; Kanha et al., 2019)، روتین (Fan et al., 2019)، عصاره چای (Chung et al., 2016)، عصاره گل رز (Mollov et al., 2007) و عصاره پوست انار (Ertan et al., 2018) به‌عنوان کوپیگمان صورت گرفته است. با این حال، تاکنون گزارشی در مورد تاثیر این کوپیگمان‌ها و همچنین سیکلودکسترین‌ها بر پایدارسازی آنتوسیانین گلبرگ زعفران گزارش نشده است.

باتوجه به کاربرد گسترده رنگدانه‌های طبیعی جهت بهبود ظاهر غذا و نوشیدنی از یک طرف و وجود معایب آن‌ها ازقبیل پایداری نسبتا پایین در مقایسه با رنگ‌های سنتزی از طرف دیگر، پایدارسازی آن‌ها ضرورت دارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر آلفا و بتاسیکلودکسترین و همچنین مهمترین کوپیگمان‌ها جهت پایدارسازی حرارتی آنتوسیانین استخراجی از گلبرگ زعفران بود. علاوه بر این، باتوجه به غنی بودن عصاره نسترن کوهی از ترکیبات فنولی (Saberian, 2018)، این عصاره نیز به عنوان یک ترکیب کوپیگمان مورد استفاده قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

گلبرگ خشک زعفران از مزارع زعفران مشهد تهیه شد. اتانول با درجه آزمایشگاهی از شرکت دکتر مجللی (صنایع شیمیایی دکتر مجللی، ایران) خریداری شد. سیتریک اسید، فرولیک اسید، گالیک اسید، روتین، کوئرستین، سدیم سیترات، آلفا و بتاسیکلودکسترین از شرکت تیتراکم خریداری شد. میوه نسترن کوهی از لرستان تهیه شد.

---

۱ Copigmentation

۲ Red shift

### استخراج عصاره آنتوسیانینی

به‌منظور استخراج آنتوسیانین موجود در گلبرگ زعفران، از روش بهینه شده توسط Bolourian (۲۰۲۰) استفاده شد. ابتدا گلبرگ زعفران خشک شده در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد توسط آسیاب آزمایشگاهی خرد شده و پودر با مش ۱۶ تهیه شد و پس از توزین، با حلال (اتانول ۵۰٪ اسیدی شده با pH برابر با ۲) به نسبت ۱:۲۵ (حجمی/ وزنی) دردمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۲ دقیقه به‌منظور استخراج قرار گرفت (Bolourian, 2020). در مرحله بعد، عصاره استخراج شده با استفاده از سانتریفوژ وکاغذ صافی واتمن صاف گردید. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه اواپراتور تحت خلأ در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به بریکس حدود ۹ تغلیظ شد و تا زمان کاربرد، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس این عصاره در روش‌های مختلف پایدارسازی به‌کار برده شد (Khazaei et al., 2014).

### تولید نوشیدنی مدل

نوشیدنی مدل حاوی ۸٪ (وزنی/ وزنی) عصاره آنتوسیانینی و ۰/۰۱٪ کلرید کلسیم در بافر اسید سیتریک ۲۰ میلی‌مولار با pH برابر با ۳ تهیه شد (Chung et al., 2015).

### بهینه‌سازی استفاده از غلظت‌های مختلف سیکلودکسترین (آلفا و بتا)

نسبت‌های مختلف مولی آلفا و بتاسیکلودکسترین به آنتوسیانین (براساس سیانیدین گلوکوزاید) جهت بررسی تاثیر پایدارسازی آن‌ها بر آنتوسیانین‌ها بررسی شد. این نسبت‌ها شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/ بتاسیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین بود (Howard et al., 2013). ابتدا نوشیدنی مدل در pH برابر ۳ تهیه شد. pH پایین این اطمینان را ایجاد می‌کند که آنتوسیانین به صورت یون فلاویلیوم باشد و از تخریب محافظت شود. سپس نسبت‌های سیکلودکسترین فوق به نوشیدنی مدل افزوده شد و محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰ دور بر دقیقه همزده شد. سپس به مدت ۲ ساعت به حال خود رها شد تا به تعادل برسد و آماده تیمار حرارتی شد (Fernandes et al., 2013).

### کوپیگمانتاسیون عصاره آنتوسیانینی با استفاده از ترکیبات مختلف

در این مرحله، کوپیگمان‌های مهمی که در پژوهش های سایر محققین به عنوان کوپیگمان در پایدارسازی آنتوسیانین‌ها موثر شناخته شده بودند، به‌کار گرفته شد. این کوپیگمان‌ها شامل گالیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، فرولیک اسید (در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ نسبت به آنتوسیانین)، کوئرستین (در دو نسبت مولی ۲/۵ به ۱ و ۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) و روتین (در دو نسبت مولی ۱۰ به ۱ و ۲۵ به ۱ نسبت به آنتوسیانین) بود (Weber et al., 2017; Fan et al., 2019; Shikov et al., 2008). علت اینکه از غلظت‌های کمتری از کوئرستین و روتین استفاده شد، عدم حلالیت مقادیر بیشتر آن‌ها در نوشیدنی بود که خود این عامل منجر به ایجاد رنگ نامطلوبی نیز در نوشیدنی می شد.

### عصاره‌گیری نسترن کوهی و کوپیگمانتاسیون عصاره آنتوسیانینی با استفاده از آن

عصاره‌گیری از میوه نسترن کوهی مطابق روش Saberian (۲۰۲۰) انجام شد. بر این اساس، استخراج دو مرحله‌ای انجام شد تا هم بیشترین میزان کاروتنوئید کل و فلاونوئید کل استخراج شود (در شرایط بهینه شامل نسبت حلال به ماده جامد ۱۴/۹۴ میلی‌لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۹۶٪) و هم بیشترین ترکیبات فنولی کل (در شرایط بهینه نسبت حلال به ماده جامد ۱۵ میلی‌لیتر بر گرم، زمان ۶ ساعت و غلظت اتانول ۳۵/۸٪ (حجمی/ حجمی)). درنهایت، عصاره‌های حاصله ترکیب شد و در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط خلأ تغلیظ شد و به روش خشک کردن انجمادی خشک شد (Saberian, 2020).

عصاره نسترن کوهی در دو نسبت مولی ۵۰ به ۱ و ۱۰۰ به ۱ (معادل گالیک اسید به آنتوسیانین) نسبت به آنتوسیانین استفاده شد. قابل ذکر است که میوه نسترن کوهی حاوی مقادیر بسیار زیادی از ترکیبات فنولی (حدود ۱۰٪ وزن ماده خشک) می‌باشد (Saberian, 2018). تاثیر کوپیگمان‌های مختلف بر پایداری حرارتی آنتوسیانین موجود در نوشیدنی مدل بررسی شد (Fan et al., 2019).

### اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین

غلظت آنتوسیانین نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis و معادله ۱ برآورد و نتایج مقایسه شد (Jafari et al., 2016).

$$\text{غلظت رنگدانه آنتوسیانین}\ (mg/L) = (A \times Mw \times DF)/\varepsilon \times L \qquad (1)$$

که در آن، $A = (A530 - A700)pH\ 1.0 - (A530 - A700)pH\ 4.5$، Mw = وزن مولکولی آنتوسیانین (۴۴۹/۲ g/mol) است، DF = فاکتور رقت، ε= ضریب (۲۶/۹۰۰ L/cmmol)، L= طول مسیر (۱ سانتی‌متر) است.

با توجه به اینکه آنتوسیانین‌های گلبرگ زعفران عمدتا از نوع سیانیدین گلیکوزید می‌باشند، نتایج بر مبنای سیانیدین ۳-گلیکوزید بیان شدند.

### استخراج و اندازه‌گیری میزان فنول کل

میزان فنول کل نمونه‌ها با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو مطابق روش Ercisli و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (Ercisli, 2007). برای این منظور، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره نمونه‌های استخراج شده در ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه برای مدت یک ساعت حل شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه صاف شده به فالکون منتقل شد. ۲/۸ میلی‌لیتر آب دیونیزه به فالکون افزوده شد. پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲٪ به فالکون و گذشت زمان ۳ دقیقه، میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالتو ۵۰٪ نیز به آن افزوده شد و سپس به‌طور کامل همزدن صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (BC47358، Biochrom، انگلستان) خوانده شد. گالیک اسید به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت و غلظت‌های ۰- ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (ppm) برای رسم منحنی استاندارد تهیه شد. نتایج به صورت میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم وزن خشک نمونه بیان شد.

### تعیین میزان فلاونوئید کل

محتوی فلاونوئید کل مطابق روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از معرف کلرید آلومینیوم اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراجی با ۱/۵ میلی‌لیتر از اتانول ۹۵٪ مخلوط شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول اتانولی کلرید آلومینیوم ۱۰٪ وزنی/ حجمی و ۰/۱ میلی‌لیتر از استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. پس از همزدن کامل محلول، به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگه‌داری شد و جذب نمونه در طول موج ۴۱۵ نانومتر در مقابل نمونه شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BC47358، Biochrom، انگلستان) خوانده شد. منحنی استاندارد کوئرستین (سیگما آلدریچ) در غلظت ۲۵- ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) رسم شد. میزان فلاونوئید کل بر اساس میزان معادل "میلی‌گرم کوئرستین در گرم عصاره" گزارش شد.

### اندازه‌گیری شاخص رنگی

برای ارزیابی رنگ‌های خوراکی طبیعی عمدتا از سیستم CIELab استفاده شد که طی آن سه شاخص روشنایی/ تاریکی (L*)، قرمزی/ سبزی (a*) و زردی/ آبی (b*) اندازه‌گیری شدند. این شاخص‌ها با استفاده از دستگاه هانترلب (HunterLab Colorflex، C04-1005-631، تایوان) صورت پذیرفت (Saberian et al., 2013).

تغییرات کلی رنگ (ΔE) نمونه ها با استفاده از معادله ۲ بر حسب پارامترهای رنگی $L^*$، $a^*$ و $b^*$ محاسبه شد:

$$\Delta E = \sqrt{\left(L_0^* - L_t^*\right)^2 + \left(a_0^* - a_t^*\right)^2 + \left(b_0^* - b_t^*\right)^2} \qquad (۲)$$

در این فرمول $L_0^*$، $a_0^*$ و $b_0^*$ مقادیر اولیه پارامترهای رنگی و $L_t^*$، $a_t^*$ و $b_t^*$ مقادیر پارامترهای رنگی نمونه ها پس از تیمار حرارتی می‌باشند (Jafari et al., 2016).

### آزمون پایداری حرارتی و بررسی کینتیک تخریب آنتوسیانین

نوشیدنی مدل (بافر اسید سیتریک ۲۰ میلی‌مولار در pH برابر با ۳) حاوی ۰/۰۱٪ کلرید کلسیم و عصاره آنتوسیانینی تهیه شد. نوشیدنی‌های مدل تهیه شده در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه حرارت داده شدند و سپس تا دمای محیط سرد شدند. زمان نیمه عمر آنتوسیانین محاسبه شد و تیمارهای ذکر شده برای بررسی تاثیر پایدارسازی، در آن زمان مورد بررسی قرار گرفتند (Chung et al., 2016; Chung et al., 2015).

زمان نیمه عمر ($T_{1/2}$) براساس غلظت آنتوسیانین از معادله زیر محاسبه شد:

$$\frac{C}{C0} = \exp(-Kt) \qquad (۳)$$

که در این فرمول C غلظت رنگدانه‌ها در زمان t (حرارت‌دهی در دماهای مختلف)، $C_0$ نشانگر غلظت رنگدانه‌های اولیه می‌باشد. K (روز$^{-1}$) ثابت سرعت واکنش است (Fan et al., 2019).

$$T1/2 = \frac{-\ln 0.5}{K} \qquad (۴)$$

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای بررسی تاثیر آلفا/ بتاسیکلودکسترین بر پایداری آنتوسیانین‌ها از طرح فاکتوریل استفاده شد. برای مقایسه تاثیر کوپیگمان‌های مختلف بر پایدارسازی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل نیز از طرح یک فاکتور در یک زمان استفاده شد. آزمایش ها به‌طور عمده در حداقل دو تکرار انجام شدند و سپس میانگین و انحراف معیار داده ها به‌دست آمد. جهت مطالعه وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارهای مختلف، از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون توکی استفاده شد. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 17 صورت پذیرفت. همچنین، زمان نیمه عمر تخریب آنتوسیانین‌ها با استفاده از نرم‌افزار Matlab 16 تعیین شد.

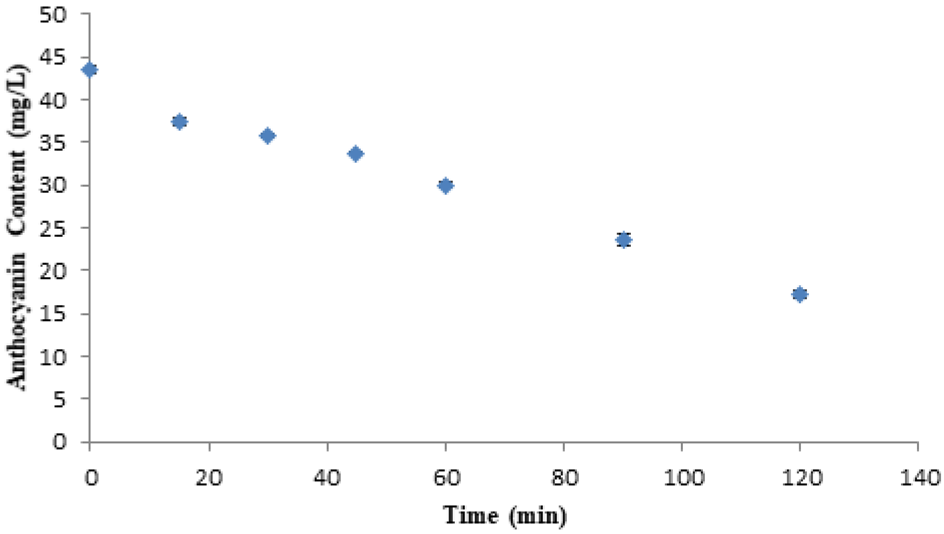
## نتایج و بحث

### پایداری حرارتی نوشیدنی مدل حاوی عصاره آنتوسیانینی

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان حرارت‌دهی، میزان آنتوسیانین به شدت کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$).

براساس شکل ۱ و همچنین با استفاده از مدل درجه یک در نرم‌افزار Matlab مشخص شد که زمان نیمه عمر تخریب آنتوسیانین ۱۰۰/۸ دقیقه است.

شاخص قرمزی نوشیدنی مدل نیز در زمان‌های مختلف حرارت‌دهی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد بررسی شد و با افزایش زمان حرارت‌دهی، شاخص قرمزی به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) کاهش یافت (داده‌ها ذکر نشده‌اند) که همبستگی خوبی با میزان آنتوسیانین دارد و نشان‌دهنده تخریب آنتوسیانین می‌باشد.




**شکل ۱- پایداری حرارتی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل**
**Fig. 1. Heat stability in the model drink**

### پایدارسازی آنتوسیانین‌ها با استفاده از آلفا/بتاسیکلودکسترین

ریزپوشانی آنتوسیانین‌ها با سیکلودکسترین ها فرآیند مطلوبی جهت کاهش تخریب آن‌ها در برابر شرایط محیطی (از قبیل نور و دما و pH و غیره) می‌باشد. آنتوسیانین‌ها قادر هستند با بتاسیکلودکسترین پیوند و تشکیل کمپلکس دهند تا از واکنش‌های هیدراتاسیون و پلی‌مریزاسیون در امان بمانند (Howard et al., 2013). جهت بررسی تاثیر پایدارسازی آلفا و بتاسیکلودکسترین بر آنتوسیانین‌ها، نسبت‌های مختلف مولی سیکلودکسترین به آنتوسیانین (بر اساس سیانیدین گلوکوزاید) بررسی شد. این نسبت‌ها شامل ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ مول آلفا/ بتاسیکلودکسترین به ازای ۱ مول آنتوسیانین بود.

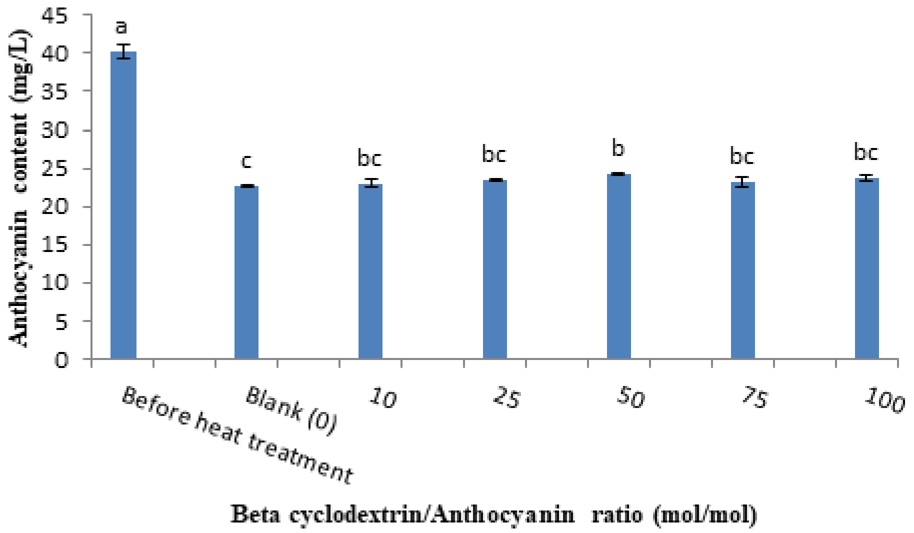
همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، افزودن بتاسیکلودکسترین در نسبت مولی ۵۰ به ۱، موجب افزایش معنی‌داری (p< ۰/۰۵) در غلظت آنتوسیانین باقی مانده در نوشیدنی مدل (نسبت به نمونه کنترل) پس از تیمار حرارتی (در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰۰/۸ دقیقه) شد و سایر نسبت‌های مولی تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل نداشتند. با این حال، افزودن آلفاسیکلودکسترین هیچگونه تاثیر معنی‌داری بر پایداری آنتوسیانین در نوشیدنی مدل نداشت (شکل ۳).

شاخص قرمزی نوشیدنی‌های مدل حاوی نسبت‌های مولی مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین قبل و بعد از تیمار حرارتی مورد بررسی قرار گرفت. علت بررسی شاخص قرمزی نوشیدنی‌ها قبل از تیمار حرارتی آن بود که در نسبت‌های مولی بالای بتاسیکلودکسترین، رنگ نوشیدنی کمی تغییر می کرد و با بررسی متغیرها در قالب طرح فاکتوریل، تغییر شاخص قرمزی اشتباها به تیمار حرارتی نسبت داده نمی‌شود.

نتایج حاکی از آن بود که تیمار حرارتی، نوع سیکلودکسترین و غلظت آن تاثیر معنی‌داری بر شاخص قرمزی داشتند (جدول ۱). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، شاخص قرمزی نمونه‌های حاوی بتاسیکلودکسترین به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های حاوی آلفاسیکلودکسترین بود. همچنین تیمار حرارتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای شاخص قرمزی را تحت تاثیر قرار داد و موجب کاهش آن شد که می‌تواند به تخریب آنتوسیانین‌ها طی تیمار حرارتی نسبت داده شود.

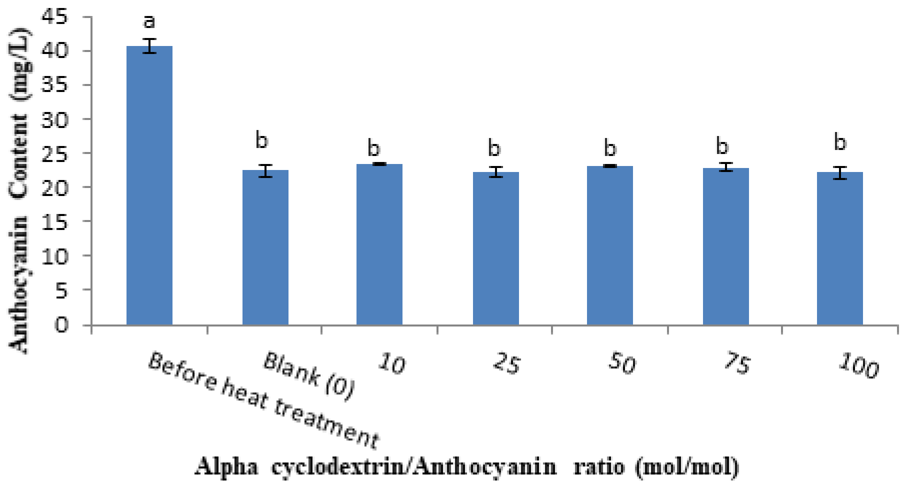
توانایی مولکول‌های حلقوی برای تشکیل کمپلکس با یک مولکول مهمان وابسته به دو عامل ممانعت فضایی و برهمکنش‌های ترمودینامیکی بین ترکیبات مختلف سیستم (سیکلودکسترین، مولکول مهمان و حلال) می‌باشد. چندین نیرو ازقبیل نیروهای واندروالسی (برهمکنش‌های هیدروفوبی و دی‌پل- دی‌پلی) و برهمکنش‌های پیوند هیدروژنی در واکنش بین حفره سیکلودکسترین و مولکول مهمان نقش

دارند که قادر به تشکیل کمپلکس پایدار هستند (Bourvellec, 2003). Fernandes و همکاران (۲۰۱۳) که تاثیر نسبت‌های مولی مختلف آلفا و بتاسیکلودکسترین (۴- ۵۰ مول) به (یک مول) سیانیدین ۳-گلیکوزید را بررسی می‌کردند مشاهده کردند که افزودن بتاسیکلودکسترین منجر به کاهش رنگ محلول آنتوسیانینی شد و این کاهش رنگ در pHهای بالاتر بیشتر بود. با این حال، با افزودن آلفاسیکلودکسترین، هیچگونه تغییری در رنگ محلول آنتوسیانینی مشاهده نکردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که به خاطر کوچک‌تر بودن حفره آلفاسیکلودکسترین نسبت به نوع بتا، احتمالا برهمکنش‌های زیادی بین حفره آلفاسیکلودکسترین و آنتوسیانین برقرار نشده است و بنابراین پیوندهای ضعیف‌تری برقرار شده است (Fernandes et al., 2013). Howard و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند که افزودن ۳٪ بتاسیکلودکسترین به عصاره Chokeberry در pHهای مختلف ۲/۸ تا ۳/۶ موجب افزایش غلظت آنتوسیانین محلول آزمون به میزان ۴۹٪ نسبت به نمونه کنترل شد.




**شکل ۲- تاثیر نسبت مولی بتاسیکلودکسترین به آنتوسیانین بر پایداری آنتوسیانین پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی‌گراد**

**Fig. 2. The effect of molar ratio of β-cyclodextrin to anthocyanin on the anthocyanin stability after 100 min heat treatment at 90°C**




**شکل ۳- تاثیر نسبت مولی آلفاسیکلودکسترین به آنتوسیانین بر پایداری آنتوسیانین پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی‌گراد**

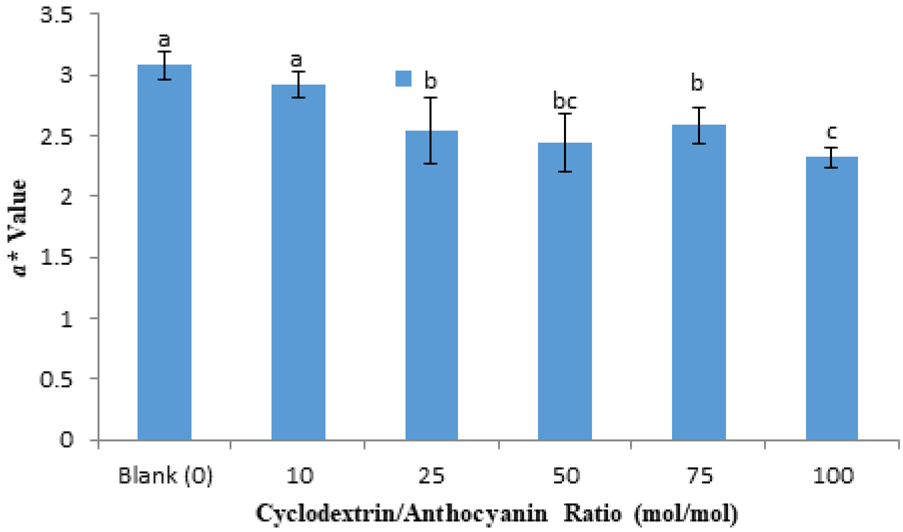
**Fig. 3. The effect of molar ratio of α-cyclodextrin to anthocyanin on the anthocyanin stability after 100 min heat treatment at 90°C**

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر سیکلودکسترین ها بر شاخص قرمزی

**Table 1- The variance analysis of the effect of cyclodextrins on the a* value**

| Source | DF | SS | MS | F-Value | P-Value |
|---|---|---|---|---|---|
| T1 | 1 | 7.9138 | 7.91375 | 529.57 | 0.000 |
| T2 | 1 | 2.6744 | 2.67435 | 178.96 | 0.000 |
| T3 | 5 | 3.4392 | 0.68784 | 46.03 | 0.000 |
| T1*T2 | 1 | 2.6744 | 2.67435 | 178.96 | 0.000 |
| T1*T3 | 5 | 7.2338 | 1.44677 | 96.81 | 0.000 |
| T2*T3 | 5 | 0.0942 | 0.01884 | 1.26 | 0.313 |
| T1*T2*T3 | 5 | 0.0942 | 0.01884 | 1.26 | 0.313 |
| Error | 24 | 0.3586 | 0.01494 | | |
| Total | 47 | 24.4825 | | | |

T1: heat treatment (before and after), T2: Cyclodextrin type (α and β), T3: Cyclodextrin/anthocyanin molar ratio (10:1 to 100:1)




**شکل ٤- تاثیر نسبت مولی سیکلودکسترین ها به آنتوسیانین بر شاخص قرمزی نوشیدنی مدل پس از ۱۰۰ دقیقه تیمار حرارتی در ۹۰ درجه سانتی‌گراد**

**Fig. 4. The effect of molar ratio of cyclodextrins to anthocyanin on the a* value of the model drink after 100 min heat treatment at 90°C**

این اثر متفاوت بتاسیکلودکسترین ممکن است به خاطر این باشد که عصاره Chokeberry دارای ترکیبات فنولی دیگری است که به واکنش با بتاسیکلودکسترین کمک می‌کند. بنابراین بتاسیکلودکسترین ممکن است در برخی از سیستم‌های غذایی جهت پایداری آنتوسیانین‌ها مفید واقع شود (Fernandes et al., 2013; Howard et al., 2013).

نتایج این پژوهش نیز حاکی از تاثیر معنی‌دار بتاسیکلودکسترین (در نسبت مولی ۵۰ قسمت بتاسیکلودکسترین به ۱ قسمت مولی آنتوسیانین) و عدم تاثیر آلفاسیکلودکسترین بر پایدارسازی آنتوسیانین در نوشیدنی مدل بود که می‌تواند ناشی از بزرگتر بودن مولکول بتاسیکلودکسترین و توانایی آن در احاطه کردن مولکول‌های آنتوسیانینی باشد (Fernandes et al., 2013).

### پایداری آنتوسیانین‌ها با روش کوپیگمانتاسیون

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، کوپیگمان‌های خالص تاثیری بر پایدارسازی آنتوسیانین‌های نوشیدنی مدل نداشتند به‌طوری که میزان بقاء آنتوسیانین‌های نوشیدنی‌های حاوی کوپیگمان‌های خالص، مشابه نمونه شاهد بود و تفاوت معنی‌داری (p< ۰/۰۵) با آن نداشتند. تنها عصاره نسترن کوهی در هر دو نسبت مولی ۵۰ و ۱۰۰ به ۱ (معادل گالیک اسید) به آنتوسیانین موجب افزایش بقاء آنتوسیانین شد. میزان ترکیبات فنولی کل عصاره نسترن کوهی ۱۴/۵۶ گرم (معادل گالیک اسید) بر لیتر و میزان فلاونوئید کل موجود در آن ۳۶۵ میلی‌گرم (معادل کوئرستین) بر لیتر به‌دست آمد. بنابراین، بر اساس نتایج مربوط به میزان ترکیبات فنولی کل و فلاونوئید کل در این پژوهش، این

افزایش بقاء آنتوسیانین می‌تواند به حضور تنوعی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره نسبت داده شود.

شاخص تغییر رنگ کل نشان‌دهنده تغییر رنگ نوشیدنی مدل حاوی کوپیگمان‌های مختلف پس از تیمار حرارتی (نسبت به قبل از تیمار حرارتی) می‌باشد. بنابراین ترجیح بر این است تا تغییر رنگ کل کمتر باشد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، شاخص تغییر رنگ کل تحت تاثیر میزان و نوع کوپیگمان قرار گرفت به‌طوری که با افزودن کوئرستین و روتین، این شاخص به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد که می‌تواند ناشی از حلالیت پایین این کوپیگمان‌ها در نوشیدنی مدل باشد. تغییر رنگ کلی نوشیدنی مدل حاوی عصاره نسترن کوهی نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه شاهد بود که این مورد نیز می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات فنولی نامحلول در آب باشد.

**جدول ۲- تاثیر کوپیگمان‌های مختلف بر شاخص های بقاء آنتوسیانین و تغییر رنگ کل نوشیدنی مدل**

**Table 2- The effect of different copigments on the anthocyanin retention and total color change (ΔE) of the model drink**

| Copigman | Molar ratio of copigment/Anthocyanin | Anthocyanin retention (%) | ΔE |
|---|---|---|---|
| **Blank** | 0 | 51.6 +1.11[a] | 1.37 +0.04[d] |
| **Galic acid** | 50:1 | 51.00 +0.28[a] | 1.68 +0.16[d] |
| | 100:1 | 46.26 +0.11[a] | 1.85+ 0.14[d] |
| **Quercetin** | 2.5:1 | 49.92 +0.23[a] | 4.01 +0.23[c] |
| | 5:1 | 48.58 +0.5[a] | 4.05 +0.68[c] |
| **Ferolic acid** | 50:1 | 48.46 +0.35[a] | 1.69 +0.11[d] |
| | 100:1 | 48.07 +0.69[a] | 1.71 +0.04[d] |
| **Rutin** | 10:1 | 49.20 +0.22[a] | 8.43 +0.37[b] |
| | 25:1 | 45.94 +1.88[a] | 13.82 +0.18[a] |
| **Rosehip extract** | 50:1 | 54.31 +0.17[b] | 4.73 +0.07[c] |
| | 100:1 | 58.84 +1.59[b] | 3.66 +0.24[c] |

Kanha و همکاران (۲۰۱۹) کوپیگمانتاسیون بین مولکولی سیانیدین ۳-گلیکوزاید با سه ترکیب فنولی بدون رنگ را (کاتکین، اسید فرولیک و دوپامین) در نسبت‌های مولی ۱:۱، ۱:۱۰ و ۱: بررسی کردند (Kanha et al., 2019). نتایج آن‌ها نشان داد که قوی‌ترین واکنش کوپیگمانتاسیون در نسبت مولی ۱:۱۰۰ کاتکین به‌دست آمد و اسید فرولیک و دوپامین در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند. آن‌ها مشاهده کردند که شدت تخریب حرارتی رنگدانه با افزایش دمای حرارت از ۵۰ به ۹۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. علاوه براین، آن‌ها کاهش آنتوسیانین عصاره توت فرنگی را در حضور نسبت‌های مولی مختلف کاتکین (۱:۰ تا ۱:۱۰۰) پس از پاستوریزاسیون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بررسی کردند. عصاره کوپیگمان شده در نسبت ۱:۱۰۰ دارای کمترین *L، بیشترین *C و کوچکترین زاویه h بود که نشانگر تشدید رنگ عصاره توت فرنگی است. حضور کاتکین در نسبت مولی ۱:۱۰۰، تخریب آنتوسیانین پس از پاستوریزاسیون را از ۲۲/۴۴ درصد (نمونه شاهد) به ۶/۶۷ درصد کاهش داد. Zhao و همکاران (۲۰۲۰) مشاهده کردند که تفاوت‌های زیادی بین سیستم‌های مختلف پیگمان کوپیگمان وجود داشت و توانایی ایجاد پیوند با آنتوسیانین‌ها در کوئرستین بیشتر از اپی‌کاتکین بود و گالیک اسید در مرتبه سوم قرار داشت (Zhao et al., 2020). Weber و همکاران (۲۰۱۷) مشاهده کردند که حضور کوپیگمان‌های روتین و اسید فرولیک به‌طور قابل توجهی پایداری آنتوسیانین‌ها را طی انبارداری پودر آنتوسیانینی تولید شده با استفاده از خشک‌کن پاششی افزایش داد. آن‌ها بیان کردند که ترکیبات کوپیگمانی می‌توانند همانند محلول‌ها، تشکیل کمپلکس دهند و از این طریق از هیدراته شدن رنگدانه‌ها توسط رطوبت موجود در محیط جلوگیری کنند. از طرف دیگر، به خاطر ویژگی آنتی‌اکسیدانی، کوپیگمان‌های افزوده شده می‌توانند از اکسیداسیون آنتوسیانین‌ها جلوگیری به عمل آورند (Weber et al., 2017). Fan و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که کوپیگمان‌ها باعث افزایش شاخص قرمزی، کاهش شاخص روشنایی و تغییر رنگ کل نسبت به نمونه کنترل شدند. نتایج آن‌ها نشان داد که روتین و فرولیک اسید که بهترین اثرات را بر پایداری رنگدانه داشتند، دارای حجم مولکولی بزرگتر و انرژی واندروالسی نسبت به سایر اسیدهای فنولی بودند و بنابراین، ساختار کوپیگمان رابطه مهمی‌با اثر کوپیگمانتاسیونی بر آنتوسیانین دارد (Fan et al., 2019). Chung و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که با افزودن عصاره چای سبز (به میزان ۰/۲ درصد)، نیمه عمر تخریب رنگ آنتوسیانین از ۲/۹ روز به ۶/۷ روز افزایش یافت که احتمالا به خاطر برهمکنش‌های هیدروفوبیک ترکیبات موجود در عصاره چای سبز با آنتوسیانین‌ها باشد. آن‌ها نتیجه گرفتند که افزودن کوپیگمان‌هایی ازقبیل وانیلین، ممکن است موجب بهبود پایداری آنتوسیانین‌ها شود اما بوی وانیل را نیز به نوشیدنی اضافه می‌کند اما عصاره چای سبز بوی ضعیفی دارد. با این حال عصاره چای سبز دارای رنگ متمایل به زرد است که عمدتا در ترکیب با آنتوسیانین‌ها پوشانده می‌شود. بنابراین تاثیر کوپیگمان‌ها بر طعم و رنگ، ملاحظاتی

است که باید در انتخاب ترکیبات پلی‌فنولی مورد توجه واقع شود (Chung et al., 2016). Kopjar و همکاران (۲۰۱۴) پایداری آنتوسیانین‌ها با عصاره چای سبز را به کوپیگمانتاسیون نسبت دادند که موجب می‌شود تا از حمله مولکول های آب به یون فلاویلیوم و کاهش رنگ آن جلوگیری کنند (Kopjar et al., 2014). Mollov و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که با افزودن عصاره گلبرگ، زمان نیمه عمر آنتوسیانین توت فرنگی از ۱۳۱ روز به ۱۷۳ روز افزایش یافت. همچنین پس از ۴ ساعت حرارت‌دهی، اختلاف رنگ کل در نوشیدنی‌های حاوی عصاره گلبرگ کمتر از نمونه کنترل بود و پایداری رنگ بیشتر بود (Mollov et al., 2007). Ertan و همکاران (۲۰۱۸) مشاهده کردند که اسید گالیک و عصاره پوست انار پایداری بیشتری را برای آنتوسیانین‌ها در نکتار آلبالو به ارمغان آورد اگرچه کمترین کدورت نیز در آغاز نگه‌داری و در نکتار حاوی عصاره پوست انار مشاهده شد و بنابراین عصاره پوست انار را به‌عنوان بهترین کوپیگمان (بدون توجه به نوع شیرین‌کننده) انتخاب کردند (Ertan et al., 2018).

اگرچه بسیاری از تحقیقات انجام شده حاکی از تاثیر معنی‌دار و مثبت کوپیگمان‌های خالص مختلف بر پایداری آنتوسیانین‌ها بودند اما در تحقیق حاضر چنین نتیجه‌ای حاصل نشد. این امر می‌تواند به دلیل زمان طولانی حرارت‌دهی (۱۰۰/۸ دقیقه) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد باشد که معادل زمان نیمه‌عمر آنتوسیانین عصاره گلبرگ زعفران در نوشیدنی مدل بود. علاوه بر این، ماهیت عصاره‌های آنتوسیانینی و ترکیبات مختلف فنولی موجود در آن‌ها نیز می‌تواند تاثیر مهمی بر کوپیگمانتاسیون گذاشته باشد. با این حال، عصاره نسترن کوهی موجب افزایش بقاء آنتوسیانین گردید که می‌تواند به وفور و تنوع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آن نسبت داده شود. اگرچه به نظر می‌رسد که عامل اصلی کوپیگمانتاسیون در عصاره نسترن کوهی، ترکیبات فنولی باشد اما سایر ترکیبات ازقبیل کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها نیز ممکن است اثرگذار بوده باشند و نیاز به بررسی بیشتری دارد.

## نتیجه‌گیری

باتوجه به کاربرد عمده آنتوسیانین‌ها در صنایع غذایی از یک طرف و پایداری نسبتا پایین آن‌ها در مقایسه با رنگ‌های سنتزی، پایدارسازی آن‌ها ضرورت دارد. به نظر می‌رسد که مستعدترین منبع آنتوسیانین در ایران، گلبرگ زعفران باشد و بنابراین پایدارسازی آنتوسیانین گلبرگ زعفران مورد بررسی قرار گرفت. آلفاسیکلودکسترین تاثیر معنی‌داری بر پایدارسازی آنتوسیانین نداشت اما بتاسیکلودکسترین موجب افزایش پایداری رنگدانه شد. اگرچه ترکیبات فنولی خالص تاثیری بر پایدارسازی حرارتی آنتوسیانین نداشتند اما عصاره نسترن کوهی به‌طور معنی‌داری موجب افزایش بقاء آنتوسیانین در نوشیدنی مدل شد که می‌تواند ناشی از وجود تنوعی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در این عصاره باشد. درنهایت، استفاده از عصاره‌های فنولی گیاهان و سایر ترکیبات از قبیل (سیستئین، اسیدهای آلی و کاتیون‌ها) جهت کوپیگمانتاسیون و پایدارسازی عصاره آنتوسیانینی سایر منابع (از قبیل زرشک، کلم قرمز، انگور قرمز) پیشنهاد می‌گردد تا تاثیر آن روشن‌تر گردد.

## تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی در قالب طرح با عنوان «پایدارسازی حرارتی عصاره آنتوسیانینی گلبرگ زعفران با استفاده از روش‌های کوپیگمانتاسیون و ریزپوشانی و کاربرد آن در مدل غذایی» با کد ۶۰۲۳– ۲۰ و همچنین حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) در قالب طرح با عنوان «پایدارسازی حرارتی بتالائین چغندر قرمز با استفاده از روش‌های کوپیگمانتاسیون و ریزپوشانی و کاربرد آن در نوشیدنی و کیک» با شماره ۹۷۰۰۹۲۱۲ انجام شده است.

## منابع


1. Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytoche*mistry, *11*(3), 1139-1144. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88467-8
2. Bolourian, Sh. (2020). Optimization of the extraction the anthocyanin extract of the saffron petal. Research project, ACECR, *Research institute of the Food Science and technology*. [In Persian]
3. Bourvellec, C. (2003). *Association entre les procyanidols et les polymères pariétaux de pommes: quantification et conséquences* (Doctoral dissertation, Rennes 1).
4. Carocho, M., Barreiro, M.F., Morales, P. & Ferreira, I.C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety*, *13*, 377–99. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12065
5. Cavalcanti, R.N., Santos, D.T. & Meireles, M.A.A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems: an overview. *Food Research International*, *44*, 499–509. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007
6. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food drug analysis*, *10(3)*, 178-182.

7. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W. & McClements, D.J. (2015). Enhanced stability of anthocyanins based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation. *Food Chemistry*, 76, 761–8. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.003
8. Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*, *201*, 14-22. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.051
9. Cortez, R., Luna- Vital, D. A., Margulis, D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural pigments: stabilization methods of anthocyanins for food applications. *Comprehensive Review of Food Science and Food Safety, 16(1),* 180-198. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244
10. Einafshar, S. (2018) the production of the colorants and natural antioxidant from the saffron petal waste, *Journal of Saffron*, *1(1),* 25-33. [In Persian]
11. Ercisli, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (Rosa spp.) species. *Food Chemistry, 104(4),* 1379-1384. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.053
12. Ertan, K., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2018). Effect of sweeteners on anthocyanin stability and colour properties of sour cherry and strawberry nectars during storage. *Journal of food Science and Technology*, *55*(10), 4346-4355. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3387-4
13. Fan, L., Wang, Y., Xie, P., Zhang, L., Li, Y., & Zhou, J. (2019). Copigmentation effects of phenolics on color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. *Food chemistry*, *275*, 299-308. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103
14. Fernandes, A., Azevedo, J., Mateus, N. & Freitas, V.D. (2013). Effect of cyclodextrins on the thermodynamic and kinetic properties of cyanidin-3-O-glucoside. *Food Research International*, 51(2), 748–55. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.037
15. Ge, J., Yue, P., Chi, J., Liang, J., & Gao, X. (2018). Formation and stability of anthocyanins-loaded nanocomplexes prepared with chitosan hydrochloride and carboxymethyl chitosan. *Food Hydrocolloids*, *74*, 23-31. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.029
16. Howard, L.R, Brownmiller, C., Prior, R.L. & Mauromoustakos, A. (2013). Improved stability of chokeberry juice anthocyanins by β-cyclodextrin addition and refrigeration. *Journal of Agriculture of Food Chemistry*, 61(3), 693–9. https://doi.org/10.1021/jf3038314
17. Jafari, S. M., Mahdavi-Khazaei, K., & Hemmati-Kakhki, A. (2016). Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymer*, *140*, 20-25. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.079
18. Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P., Regenstein, J. M., & Laokuldilok, T. (2019). Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: Thermodynamic data and thermal stability. *Food Bioscience*, *30*, 100-419. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100419
19. Khazaei, K.M., Jafari, S.M., Ghorbani, M. & Hemmati Khakki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthcyanins and evaluating their stability. *Carbohydrate Polymer*, 105, 57-62. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042
20. Kopjar, M., Bilić, B., & Piližota, V. (2014). Anthocyanins, phenols, and antioxidant activity in blackberry juice with plant extracts addition during heating. *Acta alimentaria*, *43*(2), 333-343.
21. Li, X., Xu, J., Tang, X., Liu, Y., Yu, X., Wang, Z. & Liu, W. (2016). Anthocyanins inhibit trastuzumab resistant breast cancer in vitro and in vivo. *Molecular Medicine Report*, *13*, 4007–4013.
22. Mazza, G. & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton: CRC Press.
23. Mollov, P., Mihalev, K., Shikov, V., Yoncheva, N., & Karagyozov, V. (2007). Colour stability improvement of strawberry beverage by fortification with polyphenolic copigments naturally occurring in rose petals. *Innovative Food Science Emerging Technology*, *8*(3), 318-321. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.004
24. Saberian, H. (2018). The comparison of the quality properties of the rosehip powder of some regions of Iran with commercial sample, *Journal of food Science and Technology*, *15 (82),* 139-149. [In Persian]
25. Saberian, H. (2020). Production of food supplement of rosehip as a capsule to treat arthritis, ACECR, Research institute of the Food Science and technology. [In Persian]
26. Saberian, H., Hamidi-Esfahani, Z., & Abbasi, S. (2013). Effect of pasteurization and storage on bioactive components of Aloe vera gel. *Nutrition & Food Science*, *43(2),* 175-183.
27. Shikov, V., Kammerer, D. R., Mihalev, K., Mollov, P., & Carle, R. (2008). Heat stability of strawberry anthocyanins in model solutions containing natural copigments extracted from rose (*Rosa damascena* Mill.) petals. *Journal of agriculture food Chemistry*, *56*(18), 8521-8526. https://doi.org/10.1021/jf801946g
28. Sui, X., Dong, X. & Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of 2 anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry, 163,* 163–70. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.075

29. Weber, F., Boch, K., & Schieber, A. (2017). Influence of copigmentation on the stability of spray dried anthocyanins from blackberry. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 72-77. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.042
30. Zhao, X., Ding, B. W., Qin, J. W., He, F., & Duan, C. Q. (2020). Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring. *Food chemistry*, *326*, 126960. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126960